

10. 陸玲玲、間宮隆吉、鳥海和也、毛利彰宏、路平、平松正行、鄒利波、鍋島俊隆：Abnormal behavior and NMDA receptor in the postpubertal mice after prenatal exposure to phencyclidine 第 115 回日本薬理学会近畿部会（金沢）(H21.6.15.)
11. 毛利彰宏、野田幸裕、王大勇、安藤雄、脇由香里、古関竹直、間宮隆吉、鍋島俊隆：覚せい剤により誘発される精神障害に対するガラントミンの効果 第 44 回日本アルコール・薬物医学会総会・第 21 回日本アルコール精神医学会・第 12 回ニコチン・薬物依存研究フォーラム平成 21 年度合同学術集会(横浜) (H21.9.8.)
12. 青山雄紀、毛利彰宏、鳥海和也、古関竹直、成澤志穂、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：フェンサイクリジン連続投与マウスを用いた抗精神病薬の作用発現におけるヒストン修飾の関与について 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会（京都）(H21.11.13.)
13. 成澤志穂、毛利彰宏、鳥海和也、青山雄紀、古関竹直、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：フェンサイクリジン連続投与マウスの行動障害に対する注意欠陥・多動性障害治療薬の作用 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会（京都）(H21.11.13.)
14. 間宮隆吉、路平、毛利彰宏、鍋島俊隆：胎生期に受けた心理的ストレスによる成熟期以降の行動障害 第 83 回日本薬理学会（大阪）(H22.3.16)
15. Turson Alkam、平松正行、間宮隆吉、毛利彰宏、鳥海和也、鍋島俊隆：妊娠期ニコチン曝露は出生マウスの感情及び認識行動を障害する 第 83 回日本薬理学会(大阪)(H22.3.17)
16. 古関竹直、毛利彰宏、間宮隆吉、鍋島俊隆：マウスのメタンフェタミン探索行動に対するガラントミンの効果 第 83 回日本薬理学会（大阪）(H22.3.18)
17. 青山雄紀、毛利彰宏、鳥海和也、古関竹直、成澤志穂、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：クロザピンはドパミン D1 受容体を介したヒストンアセチル化によりフェンサイクリジン投与マウスに認められる行動異常を緩解する 第 83 回日本薬理学会(大阪)(H22.3.18)
18. 渡辺裕之、鳥海和也、宋梓瑜、葛丹、本荘龍輝、毛利彰宏、古関竹直、間宮隆吉、宮本嘉明、新田淳美、福島健、鍋島俊隆：薬物依存関連分子 shati 遺伝子欠損マウスにおける行動異常と脳内の生化学的な変化 第 84 回日本薬理学会年会（横浜）(H22.3.23)
19. 青山雄紀、毛利彰宏、鳥海和也、古関竹直、成澤志穂、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：フェンサイクリジンによる異常行動に対するクロザピンのエピジェネティックな作用と GABA 関連遺伝子発現 第 84 回日本薬理学会年会（横浜）(H22.3.23)
20. 毛利彰宏、肥田裕丈、安藤雄、間宮隆吉、永井拓、山田清文、鍋島俊隆、野田幸裕：新生児期の PolyI:C 投与はフェンサイクリジン投与によるグルタミン酸作動性神経伝達を障害し、異常行動を増悪させる 第 84 回日本薬理学会年会（横浜）(H22.3.23)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：「新規ステロイド誘導體及びその製造方法、並びにその新規ステロイド誘導體を含有する医薬」

出願番号：PCT/JP2010/052656

発明者：小鹿一、間宮隆吉、鍋島俊隆

化学物質による神経伝達物質受容体を介した精神毒性発現機序の解明および行動評価方法の開発に関する研究

分担研究者：山田清文¹

（名古屋大学医学部附属病院・教授）

研究協力者：永井拓¹、衣斐大祐²

（¹名古屋大学医学部附属病院、²名城大学薬学部・日本学術振興会特別研究員）

[研究要旨]

化学物質の精神毒性には、物理化学的な性質に基づくそれぞれの化学物質に固有の毒性と化学物質と生体との相互作用に基づく化学物質全般に共通する影響があると考えられる。また、周産期における化学物質への暴露は免疫毒性や異常免疫応答を誘発することが知られている。本研究では、生体との相互作用を介した化学物質による精神発達障害の機構解明を目的として、周産期における異常免疫応答が脳神経発達および成長後の脳機能に及ぼす影響について新たに動物モデルを作製して研究した。具体的には、生後 2 日目から 6 日目までの 5 日間マウスに合成 2 本鎖 RNA アナログである polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を皮下投与して周産期異常免疫応答モデル動物を作製した。PolyI:C 処置マウスが 10 週齢に達した後、学習記憶および情動行動を系統的に解析し、海馬におけるグルタミン酸作動性神経系の機能変化を *in vivo* dialysis 法を用いて解析した。また、polyI:C 処置により誘発される脳機能障害の分子機構を解明するために DNA アレイを用いて polyI:C 処置したマウス海馬における遺伝子発現変化を網羅的に解析した。さらに、初代培養神経細胞およびアストログリア細胞を用いて、神経発達に及ぼす polyI:C の効果を検討した。

PolyI:C 処置マウスは情動行動、学習記憶・認知、社会性行動の異常を示したが、これらの行動異常は抗精神病薬、ニコチンおよび D-セリンにより改善した。また、polyI:C 処置マウスでは海馬における脱分極性グルタミン酸遊離の異常とサイトカイン関連分子 *interferon-induced transmembrane protein 3* (IFITM3) mRNA の増加が認められた。マウス大脳由来培養アストログリア細胞に polyI:C を添加して 24 時間培養した培養上清 (polyI:C-ACM) を初代培養海馬神経細胞に添加すると、神経細胞の MAP2 陽性樹状突起の伸展および PSD95 陽性スパイン形成が有意に抑制された。一方、IFITM3 遺伝子欠損 (*ifitm3*^{-/-}) マウスから調製した polyI:C-ACM には、神経樹状突起およびスパイン形成の障害効果は認められなかった。さらに、野生型 (WT) マウスにおいては、polyI:C 処置により前頭葉皮質 MAP2 タンパクが減少し、12 週齢では認知記憶障害が観察されたが、*ifitm3*^{-/-} マウスでは polyI:C 処置による脳機能障害は認められなかった。

以上の結果より、polyI:C 誘発性異常免疫応答に伴う神経発達障害にはアストログリア細胞で誘導される IFITM3 が重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、神経発達期における化学物質暴露により脳内アストログリア細胞で IFITM3 が誘発されるかどうか、また、脳発達期における化学物質への

暴露により誘発される学習記憶や情動行動の異常に IFITM3 が関与しているかどうか、更に検討する必要がある。

A. 研究目的

化学物質の精神毒性には、物理化学的な性質に基づくそれぞれの化学物質に固有の毒性と化学物質と生体との相互作用に基づく化学物質全般に共通する影響があると考えられる。また、周産期（神経発達期）に暴露された様々な化学物質が免疫毒性や異常免疫応答を誘発することが知られている¹⁻³⁾。本研究では、生体との相互作用を介した化学物質による精神発達障害の機構解明を目的として、周産期における異常免疫応答が脳神経発達および成長後の脳機能に及ぼす影響について動物モデルを用いて検討した。

B. 研究方法

1. 周産期異常免疫応答動物モデルの作製

生後2日目から6日目までの5日間、マウスに合成2本鎖RNAアナログであるpolyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を5 mg/kgの用量で1日1回皮下投与し、周産期異常免疫応答動物モデルを作製した。コントロール群には溶媒として用いた生理食塩液を投与した。本研究では、ICR系マウス（日本エスエルシー、静岡）、*ifitm3*⁺マウスおよびその野生型 (WT) マウス (C57/BL6 系) を使用した。なお、本実験計画は名古屋大学医学部動物実験委員会で承認され、名古屋大学医学部実験動物指針に準じて行った。

2. 薬物処置

抗精神病薬である clozapine (5 mg/kg) および haloperidol (0.3 mg/kg) は試験開始の60分前に経口投与した。ニコチン (0.15-0.5 mg/kg) は試験開始の25分前に皮下投与した。 $\alpha 4\beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体アンタゴニスト dihydro- β -erythroidine (DH β E, 2 mg/kg) および $\alpha 7$

ニコチン受容体アンタゴニスト methyllycaconitine (MLA, 5.0 mg/kg) はニコチン処置の10分前に皮下投与した。D-セリン (0.3-1 g/kg) および L-セリン (1 g/kg) は試験開始の30分前に腹腔内投与し、NMDA 受容体アンタゴニスト MK-801 (0.1 mg/kg) は D-セリン処置の15分前に腹腔内投与した。

3. 行動解析

10週齢以上の polyI:C 処置マウスの学習記憶および情動行動の変化について、オープンフィールド試験、新奇物体探索試験、プレパルス抑制 (PPI) 試験、社会性行動試験により解析した。

4. *In vivo* dialysis 法によるグルタミン酸遊離測定

10~12週齢雄性マウスの海馬 (AP: -3.3, ML: +2.8 from bregma, DV: -2.5 mm from the skull) にプローブを挿入し1.0 μ L/minの流速でリング液を灌流した。10分毎に回収されたリング液中に含まれるグルタミン酸量を高速液体クロマトグラフィ (HTEC 500, EICOM, Corp., Kyoto, Japan) を用いて定量した。脱分極誘発性のグルタミン酸遊離量を測定する場合には60 mM KClを含むリング液を灌流した。

5. 遺伝子発現解析

網羅的な遺伝子の発現解析には、GeneChip mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix; Santa Clara, CA, USA) を用いた。コントロール群と polyI:C 投与群の間の遺伝子発現変化は線形モデルを用いて解析した。スキッチャープロットおよび階層的クラスタリング解析は SPOTFIRE 8.2.1 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) を用いた。リアルタイム PCR 法による定量では、polyI:C 最終投与24時間後の海馬から抽出した

RNA を Superscript III (Invitrogen, Eugene, OR) を用いて cDNA に変換した後、7300 real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて定量した。

6. 免疫組織化学

PolyI:C 処置マウスの脳をホルマリン固定し、interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) 発現細胞を二重免疫染色により同定した。実験には、mouse anti-neuronal nuclei antibody (NeuN, neuronal marker, 1:200, Millipore, Billerica, MA), mouse anti-gial fibrillary acidic protein antibody (GFAP, astroglial marker, 1:1000, Sigma-Aldrich), rabbit anti-IFITM3 antibody (1:100, Abcam, Cambridge, UK) を使用した。

7. ウェスタンブロット解析

PolyI:C 処置したマウスの海馬および前頭葉皮質を摘出し、ウェスタンブロット法により IFITM3 および MAP2 タンパクを定量した。実験には、rabbit anti-IFITM3 antibody (1:500, IMGENEX, San Diego, CA), rabbit anti-microtubule-associated protein 2 (MAP2) antibody (a dendritic marker, 1:5000, Millipore), mouse anti-GFAP antibody (1:2000, Sigma-Aldrich) and anti- β -actin antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を用いた。

8. 初代培養細胞系を用いた解析

8-1. マウス大脳由来アストログリア細胞の培養と polyI:C-ACM の調製

生後 0~2 日の新生仔マウスから海馬および大脳皮質を摘出した。髄膜を剥がし dispase および DNase を用いて酵素処理をした後、初代培養としてフラスコに播いた。90~95%コンフルエントになった時点で二次培養を行い、実験に用いた。ただし、*ifitm3*^{-/-}マウス由来の *ifitm3*^{-/-}アストログリア細

胞は他の細胞が混入していないことを確認し、一次培養で実験に用いた。実験を開始する 5 日前に培地を血清入り DMEM 培地から B27 サプリメントおよびグルタミンを添加した Neurobasal 培地に換えた。その後、培養アストログリア細胞に polyI:C (10 μ g/mL) を添加し、24 時間後の培養上清 (polyI:C-ACM) を初代培養神経細胞に処置した。細胞生存率は MTT アッセイで評価した。

8-2. マウス海馬由来初代培養神経細胞

妊娠 16 日目のマウスより胎児を摘出した。胎児の海馬を実体顕微鏡下で取り出し、trypsin および DNase を用いて酵素処理をした後、ポリリジンでコーティングをしたセルデスクに播いた。PolyI:C (3-10 μ g/mL) または polyI:C-ACM の添加は培養開始 2 日目に行い、1 日あるいは 5 日間培養した後、神経突起やスパインの変化を解析した。免疫細胞化学を用いての解析では、24 well プレートに 1×10^4 個/well、MTT アッセイでは 96 well プレートに 3×10^4 個/well で初代培養神経細胞を播いた。

8-3. 免疫細胞化学

4%パラホルムアルデヒドで固定した後、抗 toll-like receptor3 (TLR3)、MAP2、tau および postsynaptic density 95 (PSD95) 抗体を用いて免疫染色を行った。神経突起の長さの測定には Neurolucida ニューロントレーシングプログラム (Brainscience Idea Co. Ltd.)を用いた。

9. 統計解析

データは平均±標準誤差で示した。独立多群間の比較には一元配置分散分析 (analysis of variance, ANOVA) または反復測定分散分析法 (repeated measures ANOVA) を用い、有意差が認められた場合には Bonnferroni/Dunn の検定を行った。いずれの検定においても、危険率 5% 以下の場合を有意

差ありと判定した。2 群間の比較は Student's t-test を用いて行った。

C. 研究結果

1. 新生仔期 polyI:C 処置によるマウスの学習記憶および情動行動の変化

新生仔期に polyI:C (5 mg/kg) を連続投与すると、4 週齢までは若干の体重減少 (10% 以下、 $p < 0.05$) が観察されたが、それ以降は生理食塩水を投与したコントロール群と全く差は認められなかった。また、10 週齢の polyI:C 処置マウス脳の Nissl 染色では、脳細胞の形態・層構造に異常は認められなかった。

オープンフィールド試験において、polyI:C 処置群はコントロール群に比較して内円での滞在時間が減少し、外円での滞在時間および歩行距離が有意に増加した。したがって、polyI:C 処置マウスでは不安が増加していると考えられた (Fig. 1)。

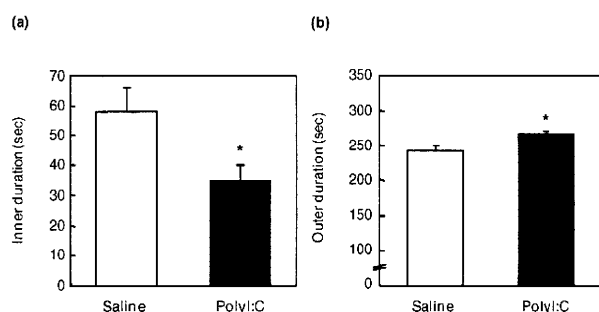


Fig. 1. Effect of neonatal polyI:C treatment on anxiety-like behavior in mice. Individual mice were allowed to explore the open field freely for 5 min. Time spent in (a) inner and (b) outer sectors. Values indicated the mean \pm SE ($n=7-8$). * $p < 0.05$ vs. saline-treated control group (Student's t-test).

新奇物体探索試験の訓練試行における総探索時間および探索嗜好性は、polyI:C 処置群とコントロール群との間で差はなく、新奇物体に対する好

奇心などには変化がないことが示唆された。一方、保持試行における探索嗜好性はコントロール群に比較して polyI:C 処置群で有意に低下しており、polyI:C 処置マウスにおける認知記憶の障害が示唆された (Fig. 2)。

プレパルス抑制試験において、polyI:C 処置群とコントロール群の間でパルス刺激により誘発される驚愕反応に差は認められなかったが、polyI:C 処置マウスではプレパルス抑制 (感覚情報処理機能) の障害が認められた (Fig. 3)。

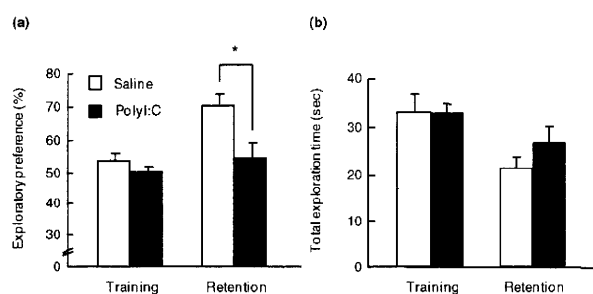


Fig. 2. Effect of neonatal polyI:C treatment on recognition memory in mice. (a) Exploratory preference. (b) Total exploration time. Values indicated the mean \pm SE ($n=8$). * $p < 0.05$ vs. saline-treated control group (Student's t-test).

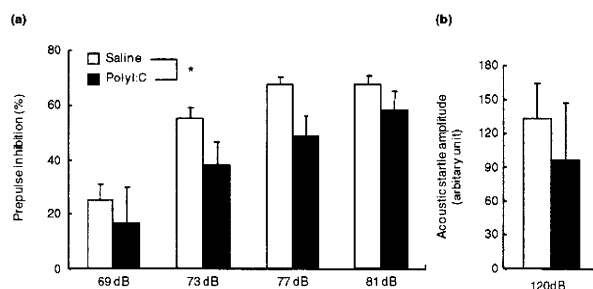


Fig. 3. Effect of neonatal polyI:C treatment on PPI in mice. (a) PPI (%) at four different prepulse intensities (69, 73, 77 and 81 dB). (b) Acoustic startle amplitude as measured in trials without prepulse. Values indicated the mean \pm SE ($n=8$). * $p < 0.05$ vs.

saline-treated control group.

社会性行動試験において、コントロールマウスでは試行を重ねるにつれて侵入マウスに対する相互作用の時間が漸減し、新奇マウスに対する慣れが観察された。PolyI:C 処置マウスでは第2試行以降の社会性行動がコントロール群に比較して有意に減少した。なお、侵入マウスに対する逃避行動や攻撃行動は何れのマウスもほとんど示さなかった。最後に NMDA 受容体アンタゴニストである MK-801 およびメタンフェタミンに対する反応性を比較したが、新生仔期 polyI:C 処置の影響は認められなかった。

2. PolyI:C 処置マウスの学習記憶および情動変化に対する抗精神病薬、ニコチンおよび D-セリンの効果

PolyI:C 処置マウスの学習記憶および情動行動の異常に対する抗精神病薬 (haloperidol: 0.3 mg/kg, clozapine: 5 mg/kg) の効果を調べた。Clozapine は polyI:C 処置マウスの学習記憶障害を有意に改善したが、haloperidol は無効であった (Fig. 4)。

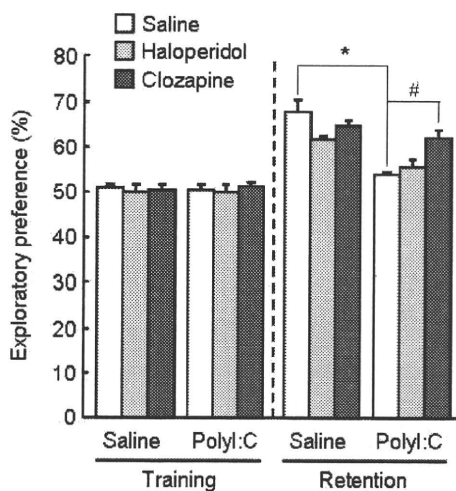


Fig. 4. Effect of antipsychotics on the impairment of

recognition memory in polyI:C-treated mice. Values indicate the mean \pm SE (n=8). * $p < 0.05$ vs. saline-injected control group, # $p < 0.05$ vs. polyI:C-injected group.

さらに、Clozapine はプレパルス抑制の障害、不安様行動の増加および社会性行動の低下など、polyI:C 処置マウスで認められるすべての行動異常に対して改善効果を示した。一方、haloperidol は polyI:C 処置マウスのプレパルス抑制の障害を改善したが、社会性行動の減少とオープンフィールド試験における不安様行動の増加には無効であった。

次に、polyI:C 処置マウスの学習記憶および情動行動の異常に対するニコチンの効果を調べた。PolyI:C 処置マウスの認知記憶障害はニコチン (0.15-0.5 mg/kg) により用量依存的に改善した。ニコチンの記憶改善効果は $\alpha 4\beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体アンタゴニスト DH β E および $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アンタゴニスト MLA により拮抗された。また、ニコチン (0.15-0.5 mg/kg) はプレパルス抑制の障害には無効であったが、社会性行動の減少と不安様行動の増加を有意に改善した。これらニコチンの改善効果も $\alpha 4\beta 2$ および $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アンタゴニストの前処置により拮抗された。

PolyI:C 処置マウスの学習記憶および情動行動の障害に対する NMDA 受容体複合体のグリシン結合部位のアゴニスト (NMDA 受容体コアゴニスト) D-セリンの効果についても検討した。オープンフィールド試験における polyI:C 処置マウスの不安様行動は D-セリン (0.3-1 g/kg) により用量依存的に改善したが、L-セリン (1 g/kg) は無効であった。さらに、D-セリンの抗不安効果は NMDA 受容体アンタゴニストである MK-801 (0.1 mg/kg) の前処置によって消失した。D-セリン (0.3-1 g/kg) はプレパルス抑制の障害には無効で

あったが、社会性行動の減少と物体認知記憶障害を有意に改善した。また、D-セリンの改善効果はMK-801の前処置によって拮抗された。すなわち、polyI:C処置マウスの記憶障害および情動行動の異常に対するD-セリンの改善効果はNMDA受容体を介していることが示唆された。

3. PolyI:C 処置マウスの海馬におけるグルタミン酸神経伝達

海馬のグルタミン酸作動性神経系の機能を調べるために *in vivo* dialysis 法を用いて細胞外グルタミン酸量を測定した。PolyI:C 処置マウスではコントロール群に比較して、海馬におけるグルタミン酸基礎遊離量が増加し、高カリウム刺激による脱分極誘発性グルタミン酸遊離は低下していた (Fig. 5)。

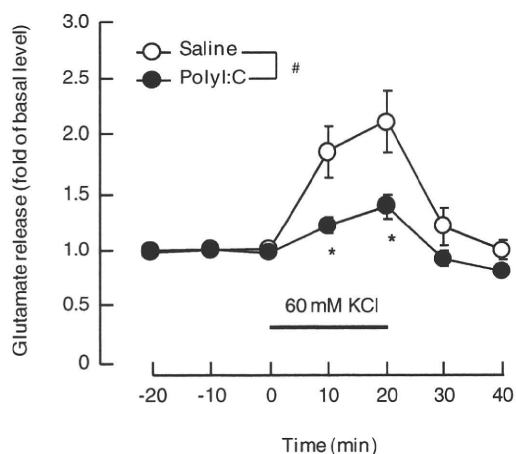


Fig. 5. Effect of neonatal polyI:C treatment on depolarization-evoked glutamate release in the hippocampus of mice. Values indicated the mean \pm SE (n=7). *p<0.05 vs. saline-treated control group (Student's t-test). #p <0.05 vs. saline-treated control group.

4. PolyI:C 処置マウス脳における IFITM3 の発現増加

リアルタイム PCR 法による解析より、IFITM3

mRNA が polyI:C 最終投与 2 時間から 24 時間後まで持続的に新生仔マウスの海馬で有意に増加することが明らかになった。ウェスタンブロット解析によりタンパクレベルも顕著に増加しており、二重免疫染色により IFITM3 は前頭葉皮質や海馬のアストログリア細胞に特異的に発現していることが判明した。IFITM3 は自閉症、双極性障害および統合失調症患者などの発達障害患者脳で増加していることが報告されているので^{4,6)}、polyI:C により誘発される異常免疫応答により神経発達が障害される可能性について培養アストログリア細胞および神経細胞を用いて検討するとともに、IFITM3 の役割について解析した。

5. PolyI:C 処置アストログリア細胞由来液性因子が神経細胞の突起伸展および細胞生存に及ぼす影響

低濃度 (3 および 10 μ g/mL) の polyI:C を培養 2 日目の海馬由来初代培養神経細胞に直接添加しても神経突起の伸展および細胞生存率に影響を与えなかった。培養アストログリア細胞に polyI:C (10 μ g/mL) を処置し、24 時間後の条件培地 (polyI:C-ACM) を培養 2 日目の神経細胞に処置すると、control-ACM を処置した神経細胞と比較して、神経突起の伸展が有意に抑制されたが、その生存率には変化は認められなかった (Fig. 6)。

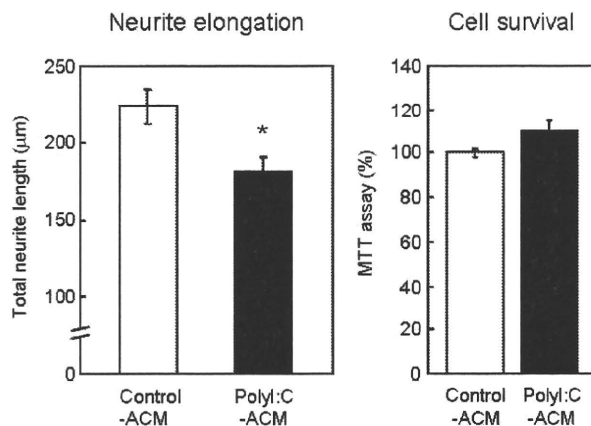


Fig. 6. Effect of polyI:C-ACM on the total neurite elongation and cell viability in primary cultured hippocampal neurons. Numbers of cells used for each calculation are 72-75 (Control-ACM: 75, PolyI:C-ACM: 72). Values are means \pm SE of three independent experiments. *P<0.05 vs. control-ACM. さらに、polyI:C-ACM で 5 日間培養すると、濃度依存的な MAP2 陽性樹状突起の伸展抑制と PSD95 陽性スパイン数の減少が認められた (Fig. 7)。

6. PolyI:C 処置アストログリア細胞由来液性因子により誘発される培養神経細胞の発達障害における IFITM3 の関与

PolyI:C-ACM による培養神経細胞の神経発達障害における IFITM3 の関与を調べるために、*ifitm3*^{-/-}マウスおよび WT マウスからそれぞれアストログリア細胞を採取、polyI:C-ACM を調製し、培養海馬神経細胞の MAP2 陽性樹状突起の伸展および PSD95 陽性スパイン数に及ぼす影響を比較した。その結果、何れバイオマーカーも WT マウス由来 polyI:C-ACM で低下したが、*ifitm3*^{-/-}マウス由来 polyI:C-ACM では変化は認められなかった (Fig. 7)。

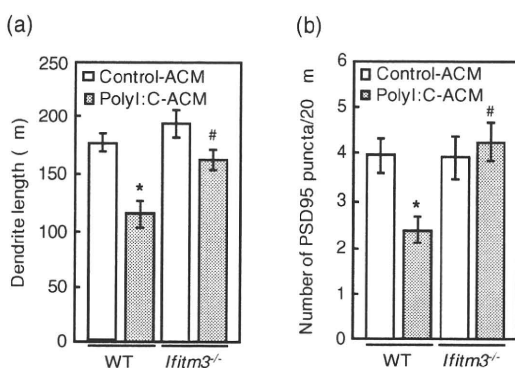


Fig. 7. Role of IFITM3 in the polyI:C-ACM-induced defect of MAP2-positive dendrite and spine formation (PSD95 puncta per 20 μ m along dendrites) of primary cultured neurons *in vitro*. Number of cells used for

each calculation are 17-20, and the values are the means \pm S.E. of three independent experiments. *p<0.05 vs. wt/control-ACM, #p<0.05 vs. wt/polyI:C-ACM.

7. PolyI:C 処置マウスにおける MAP2 タンパクの発現変化と認知機能障害における IFITM3 の関与

培養神経細胞の神経発達に対する polyI:C-ACM の阻害効果と IFITM3 の関与を *in vivo* で確認するため、新生仔 WT マウスと *ifitm3*^{-/-}マウスにそれぞれ polyI:C を 5 日間連続投与し、前頭葉皮質および海馬の MAP2 タンパク発現量をウェスタンブロット法で調べた。その結果、生後 7 日および 14 日目の WT マウス前頭葉皮質において polyI:C 処置による MAP2 タンパクの減少が認められた。一方、polyI:C 処置による MAP2 発現量の低下は *ifitm3*^{-/-}マウスでは認められなかった (Fig. 8)。

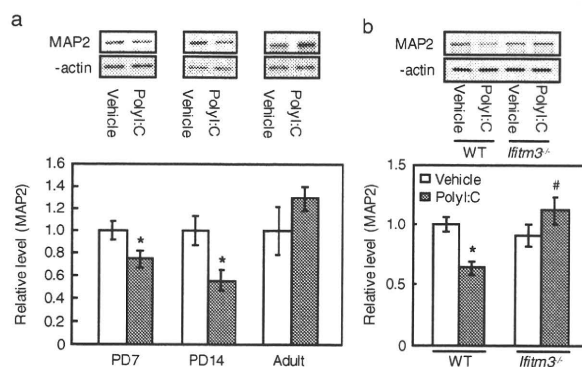


Fig. 8. Role of IFITM3 in abnormal MAP2 expression in the frontal cortex of polyI:C-treated mice. Neonatal wt and *ifitm3*^{-/-} mice were treated with polyI:C (5 mg/kg) or vehicle for 5 days from PD2 to PD7. (a) Time-course changes in MAP2 protein expression in the frontal cortex of polyI:C-treated wt mice. Values are the means \pm S.E. (n=3-5). *p<0.05 vs. vehicle-treated control mice (Student's t-test). (b) MAP2 expression in the frontal cortex in vehicle- or polyI:C-treated wt or *ifitm3*^{-/-} mice on PD14. Values

indicate the means \pm S.E. (n=9-17). *P<0.05, vs. vehicle-treated wt mice, #P<0.05, vs. polyI:C-treated wt mice.

最後に、新生仔期 polyI:C 処置により誘発される認知記憶障害における IFITM3 の関与を行動学的に解析した。WT マウスにおいては、新生仔期 polyI:C 処置により新奇物体認知試験において記憶障害が確認された。一方、*ifitm3*^{-/-}マウスの場合には、polyI:C 処置による認知記憶障害は観察されなかった (Fig. 9)。

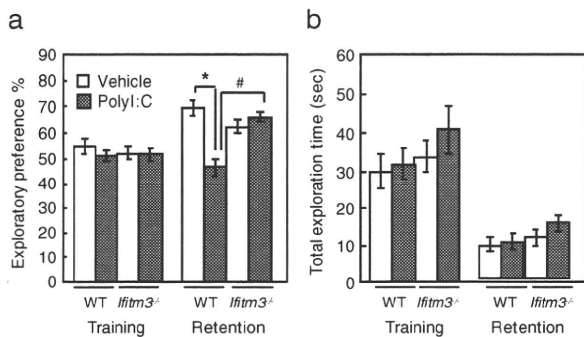


Fig. 9. Role of IFITM3 in polyI:C-induced cognitive impairment of mice in adulthood. Neonatal wt and *ifitm3*^{-/-} mice were treated with polyI:C (5 mg/kg) or vehicle for 5 days from PD2 to PD7. They were subjected to the novel object recognition test at 12 weeks old. (a) Exploratory preference. (b) Total exploration time. Values indicate the means \pm S.E. (n=8-11). *P<0.05, vs. vehicle-treated wt mice, #P<0.05, vs. polyI:C-treated wt mice.

D. 考察

本研究では、胎児期あるいは新生児期に化学物質に暴露されることにより異常免疫応答が誘発され¹⁻³⁾、神経発達障害が誘発されて学習記憶や情動行動に異常が生じるという仮説を立て、新たに動物モデルを作製して検証した。さらに、神経発達障害の分子機構についても検討した。具体的には、

グリア細胞の増殖・移動や脳-血液関門の形成が活発な新生仔期のマウス⁷⁾ (生後2日目から6日目) に二本鎖RNAアナログである polyI:C を5日間連日皮下投与して動物モデルを作製した。PolyI:C は TLR3 を活性化して炎症性サイトカインを誘導するなど、自然免疫を活性化することが知られている⁸⁾。本動物モデルはヒトにおける周産期の異常免疫応答モデルと考えられる。

PolyI:C 処置マウスは、成熟後に不安様行動の増加、認知記憶障害、感覚情報処理および社会性行動の異常を示した。*In vivo* dialysis 法を用いたグルタミン酸神経伝達の解析により、同モデルマウスの海馬ではグルタミン酸遊離の障害も確認された。さらに、polyI:C 処置マウスの行動障害に対する各種薬物の効果を検討した結果、その脳機能障害にはドーパミン、アセチルコリンおよびグルタミン酸神経系の異常が関与していることが示唆された。

PolyI:C 処置後の海馬における遺伝子発現の網羅的解析により、サイトカイン関連分子 IFITM3 の発現増加を見出した。興味深いことに、自閉症、双極性障害あるいは統合失調症患者脳では IFITM3 mRNA が増加していると報告されている^{4,6)}。しかし、神経発達における IFITM3 の役割は全く不明であることから、polyI:C 処置後の IFITM3 の詳細な発現解析と機能解析を行った。その結果、(1) IFITM3 は polyI:C 処置によりアストログリア細胞に特異的に誘導されること、(2) PolyI:C の受容体である TLR3 は神経細胞に比較してアストログリア細胞で高発現しており、polyI:C 処置によりアストログリア細胞が活性化されること、(3) 活性化されたアストログリア細胞から分泌されるグリア因子により培養神経細胞の発達障害が誘発されることが明らかになった。さらに、*ifitm3*^{-/-}マウスを用いた *in vitro* および *in vivo* 試験により、(4) 新生仔期 polyI:C 処置により誘発される前頭葉皮質の神経発達障害と認知機能障

害に IFITM3 が関与していることも示唆された。

以上の結果より、polyI:C 誘発性異常免疫応答に伴う神経発達障害にはアストログリア細胞で誘導される IFITM3 が重要な役割を果たしていると思われる。今後、神経発達期における化学物質暴露により脳内アストログリア細胞で IFITM3 が誘発されるかどうか、また、脳発達期における化学物質への暴露により誘発される学習記憶や情動行動の異常に IFITM3 が関与しているかどうか、更に検討する必要がある。

E. 結論

生体との相互作用を介した化学物質による精神発達障害の機構解明を目的として、周産期における異常免疫応答が脳神経発達および成長後の脳機能に及ぼす影響について動物モデルを用いて検討し、以下の知見を得た。

1. PolyI:C 処置マウスは、成長後に不安様行動の増加、認知機能障害および社会性行動の異常を示し、海馬におけるグルタミン酸神経伝達に異常がある。
2. PolyI:C 処置マウスの行動異常は抗精神病薬、ニコチンあるいはグルタミン酸関連薬物の投与により改善する。
3. PolyI:C 処置による神経発達障害にはアストログリア細胞の活性化と神経細胞-アストログリア細胞間の相互作用の異常が関与している。
4. アストログリア細胞で誘導される IFITM3 が新生仔期 polyI:C 処置による神経発達障害および認知機能障害に関与している。

以上より、胎児期あるいは新生児期における化学物質への暴露により異常な免疫応答が惹起されると、神経発達が障害され成熟後の脳機能に異常が生じる可能性が示唆された。今後、化学物質暴露により脳内アストログリア細胞で IFITM3 が誘発されるかどうか、また、発達期における化学

物質への暴露により誘発される学習記憶や情動行動の異常に IFITM3 が関与しているかどうか、更に検討する必要がある。

[参考文献]

1. Holladay SD, Smialowicz RJ: Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. *Environ Health Perspect., Suppl* 3:463-73, 2000.
2. Yusuf N, Timares L, Seibert MD, et al.: Acquired and innate immunity to polyaromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 224: 308-312, 2007.
3. Esser C, Rannug A, Stockinger B.: The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol.*, 30: 447-454, 2009.
4. Arion, D., Unger, T., Lewis, D.A., Levitt, P., & Mirnics, K. Molecular evidence for increased expression of genes related to immune and chaperone function in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 62:711-721 2007.
5. Iwamoto, K., Kakiuchi, C., Bundo, M., Ikeda, K. & Kato, T. Molecular characterization of bipolar disorder by comparing gene expression profiles of postmortem brains of major mental disorders. *Mol. Psychiatry*, 9:406-416, 2004.
6. Garbett, K., Ebert, P.J., Mitchell, A., Lintas, C., Manzi, B., Mirnics, K. & Persico, A.M. Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiol. Dis.*, 30: 303-311, 2008.
7. Clancy B, Darlington RB, Finlay BL: Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*, 105: 7-17, 2001.
8. Wang T, Town T, Alexopoulou L, et al.: Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the

brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.*, 10: 1366-1373, 2004.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagai, T. Nabeshima, T. and Yamada, K.: Basic and translational research on proteinase-activated receptors: Regulation of nicotine reward by the tissue plasminogen activator (tPA)-plasmin system via proteinase-activated receptor 1. *J. Pharmacol. Sci.*, 108: 4048-414, 2008.
2. Niwa, M., Nitta, A., Cen, X., Kitaichi, K., Ozaki, N., Yamada, K. and Nabeshima, T.: A novel molecule 'shati' increases dopamine uptake via the induction of tumor necrosis factor- α in pheochromocytoma-12 cells. *J. Neurochem.*, 107: 1697-1708, 2008.
3. Koike H, Ibi D, Mizoguchi H, Nagai T, Nitta A, Takuma K, Nabeshima T, Yoneda Y and Yamada K: Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behav. Brain Res.*, 202: 114-121, 2009.
4. Ibi D, Nagai T, Kitahara Y, Mizoguchi H, Koike H, Shiraki A, Takuma K, Kamei H, Noda N, Nitta A, Nabeshima T, Yoneda Y and Yamada K: Neonatal polyI:C treatment in mice results in schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neurosci. Res.*, 64: 297-305, 2009.
5. Mizoguchi H, Takuma K, Fukuzaki E, Ibi D, Someya E, Akazawa K, Alkam T, Tsunekawa H, Mouri A, Noda Y, Nabeshima T and Yamada K: Matrix metalloproteinase-9 inhibition improves amyloid β -mediated cognitive impairment and neurotoxicity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 331: 14-22, 2009.
6. Mizoguchi H, Arai S, Koike H, Ibi D, Kamei H, Nabeshima T, Kim HC, Takuma K and Yamada K: Therapeutic potential of nicotine for methamphetamine-induced impairment of sensorimotor gating: involvement of pallidotegmental neurons. *Psychopharmacology*, 207: 235-243, 2009.
7. Nagai T, Kitahara Y, Shiraki A, Hikita T, Taya S, Kaibuchi K and Yamada K: Dysfunction of dopamine release in the prefrontal cortex of dysbindin deficient sandy mice: an in vivo microdialysis study. *Neurosci. Lett.*, 470:134-8. 2010.
8. Ibi D, Nagai T, Koike H, Kitahara Y, Mizoguchi H, Niwa M, Hanna Jaaro-Peled, Nitta A, Yoneda Y, Nabeshima T, Sawa A, and Yamada Y: Combined effect of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. *Behav Brain Res.* 206:32-37, 2010.
9. Noda Y, Mouri A, Ando Y, Waki Y, Yamada SN, Yoshimi A, Yamada K, Ozaki N, Wang D, and Nabeshima T: Galantamine ameliorates the impairment of recognition memory in mice repeatedly treated with methamphetamine: involvement of allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors and dopaminergic-ERK1/2 systems. *Int J Neuropsychopharmacol.* 13:1343-1354, 2010.
10. Yu J, Nagai T, Ibi D, Kitahara Y, Nabeshima T and Yamada K: Nicotine ameliorates emotional and cognitive impairments induced by neonatal polyI:C treatment in mice. *The Open Behavioral Science Journal.* 4:9-18, 2010.
11. Mizoguchi H, Ibi D, Takuma K, Toth E, Sato J, Itohara S, Nabeshima N and Yamada K: Alterations of emotional and cognitive behaviors in matrix metalloproteinase-2 and -9-deficient mice. *The Open Behavioral Science Journal.* 4:19-25, 2010.
12. Yun J, Koike H, Ibi D, Toth E, Mizoguchi H, Nitta A, Yoneyama M, Ogita K, Yoneda Y, Nabeshima T, Nagai T, and Yamada K: Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J. Neurochem.* 114:1840-1851, 2010.
13. Shin EJ, Whang WK, Kim S, Bach JH, Kim JM, Nguyen XK, Nguyen TT, Jung BD, Yamada K, Nabeshima T, Kim HC: Parishin C Attenuates Phencyclidine-Induced Schizophrenia-Like Psychosis in Mice: Involvements of 5-HT(1A)

Receptor. *J. Pharmacol Sci.* 113(4):404-8 2010.

14. Mizoguchi H, Ibi D, Takase F, Nagai T, Kamei H, Toth E, Sato J, Takuma K, Yamada K. Nicotine ameliorates impairment of working memory in methamphetamine-treated rats. *Behav Brain Res*, in press.

2. 学会発表

1. Ibi D, Nagai T, Mizoguchi H, Nitta A, Takuma K and Yamada K: Development of schizophrenia-like behaviors and susceptibility gene expression in a viral infection model during perinatal stage. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders (Nagoya, Japan, September 24, 2008.)
2. Yamada K, Ibi D, Kitahara Y, Nabeshima T and Nagai T: Perinatal immune activation impairs emotional and cognitive functions with altered hippocampal glutamatergic neurotransmission in adult mice. The 9th World Congress of Biological Psychiatry (Paris, France, June 28-July 2, 2009)
3. Nagai T, Ibi D, Koike H, Kitahara Y, Nabeshima T, Sawa A and Yamada K: Synergistic impacts of DISC1 mutation and neonatal polyI: C treatment on adult phenotypes in mice: A novel mouse model of schizophrenia with gene - environment interactions. The 9th World Congress of Biological Psychiatry (Paris, France, June 28-July 2, 2009)
4. Ibi D, Nagai T, Nitta A, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K.: The effect of polyI:C treatment on endophenotypes in dominant-negative DISC1 transgenic mice. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. (Nagoya, Japan, September 16-18, 2009)
5. Nagai T, Ibi D, Mizoguchi H, Nabeshima T, Yamada K.: Neonatal poly:C treatment in mice induces schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. Society for Neuroscience2009 (Chicago, USA, October 17-21, 2009)
6. Ibi D, Nagai T, Mizoguchi H, Nitta A, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K: Synergistic influence of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. Society for Neuroscience2009 (Chicago, USA, October 17-21, 2009)
7. Ibi D, Nagai T, Kitahara Y, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K: Effect of antipsychotics on the behavioral deficits in human dominant-negative disc1 transgenic mice with neonatal polyI:C treatment. International Behavioral Neuroscience Society (IBNS) Annual Meeting (Sardinia, Italy, June 8-13 2010)
8. Yamada K: Role of pallidotegmental GABAergic neurons in PPI of the acoustic startle reflex. International Behavioral Neuroscience Society (IBNS) Annual Meeting (Sardinia, Italy, June 8-13, 2010)
9. Yamada K: A role of the pallidotegmental GABAergic neurons in sensorimotor gating. The International Conference of Pharmacology- 3rd Mainland, Taiwan and HongKong Symposium of Pharmacology (Shenyang, China, September 24-27, 2010)
10. Yu J, Ikejima T, Yu X, Zhang W, Nagai T, Nabeshima T, Yamada K: The NMDA receptor co-agonist D-serine ameliorates emotional and cognitive impairment in polyI:C-treated mice. The International Conference of Pharmacology- 3rd Mainland, Taiwan and HongKong Symposium of Pharmacology (Shenyang, China, September 24-27, 2010)
11. Yukihiro Noda, Akihiro Mouri, Hirotaka Hida, Yu Ando, Kiyofumi Yamada, Toshitaka Nabeshima: Immune activation during neonatal exacerbates phencyclidine-induced behavioral phenotypes in adult mice. The International Conference of Pharmacology- 3rd Mainland, Taiwan and HongKong Symposium of Pharmacology (Shenyang, China, September 24-27, 2010)
12. Yamada K, Yun J, Koike H, Ibi D, T. Nagai T: Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent contextual memory in mice: a possible role of NPAS4. APSN 2010 (Phuket, Thailand, October 17-20, 2010)

13. 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 小池宏幸, 田熊一徹, 山田清文: 周産期ウイルス感染モデルにおける認知障害. 第 31 回日本神経科学大会, 東京, 2008.7.9-11.
14. 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 田熊一徹, 北原裕子, 小池宏幸, 日比(古川)陽子, 新田淳美, 米田幸雄, 山田清文: 周産期におけるウイルス感染が精神機能発達および統合失調症関連遺伝子発現に及ぼす影響. 第 18 回日本臨床精神神経薬理学会・第 38 回日本神経精神薬理学会合同年会, 東京, 2008.10.1-3.
15. 北原裕子, 永井拓, 衣斐大祐, 新田淳美, 山田清文: 周産期における免疫応答異常が精神機能発達およびグルタミン酸作動性神経系に及ぼす影響. 第 114 回日本薬理学会近畿部会, 神戸, 2008.11.4.
16. 永井拓, 北原裕子, 衣斐大祐, 山田清文: 周産期 polyriboinosine:polyribocytidylic acid 投与による精神機能発達およびグルタミン酸作動性神経系の変化. 第 19 回マイクロダイアリシス研究会, 東京, 2008.12.6.
17. 永井拓, 衣斐大祐, 溝口博之, 鍋島俊隆, 山田清文: 周産期における免疫異常は思春期マウスにおける情動および認知機能を障害する. 第 2 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 京都, 2008.12.20-21.
18. 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 北原裕子, 小池宏幸, 新田淳美, 米田幸雄, 澤明, 鍋島俊隆, 山田清文: 新生児期 polyI:C 投与がドミナントネガティブ型 DISC1 トランスジェニックマウスの情動・認知機能に及ぼす影響. 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜, 2009.3.16-18.
19. 山田清文: 遺伝-環境相互作用に基づく統合失調症モデル. 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜, 2009.3.16-18.
20. 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 北原裕子, 小池宏幸, 新田淳美, 米田幸雄, 澤明, 鍋島俊隆, 山田清文: 新生児期 polyI:C 投与がドミナントネガティブ型 DISC1 トランスジェニックマウスの情動・認知機能に及ぼす影響. 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜, 2009.3.16-18.
21. 北原裕子, 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 小池宏幸, YU Jinghua, 新田淳美, 米田幸雄, 鍋島俊隆, 山田清文: 周産期ウイルス感染により誘発される統合失調症の神経発達モデルにおける行動およびグルタミン酸神経伝達異常. 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜, 2009.3.16-18.
22. 北原裕子, 永井拓, 衣斐大祐, 新田淳美, 澤明, 鍋島俊隆, 山田清文: 新生児期 polyI:C 投与ドミナントネガティブ型 DISC1 トランスジェニックマウスにおけるグルタミン酸作動性神経系の機能解析. 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会合同年会, 京都, 2009.11.13-15.
23. 山田清文: Poly:C 誘発神経発達障害動物モデルの行動異常とその発現機構. 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 公開シンポジウム 2009, 春日井, 2009.12.18.
24. 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 鍋島俊隆, 山田清文: Poly:C 処置アストロサイト由来の液性因子が初代培養神経細胞におよぼす影響. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪 2010.3.16~18.
25. 北原裕子, 永井拓, 衣斐大祐, 鍋島俊隆, 澤明, 山田清文: 新生仔期 poly:C 投与ドミナントネガティブ型 DISC1 トランスジェニックマウスの行動異常に対する抗精神病薬の効果. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.16~18.
26. 于静華, 永井拓, 衣斐大祐, 北原裕子, 鍋島俊隆, 山田清文: Emotional and cognitive impairment induced by polyI:C was ameliorated by NMDA receptor co-agonist D-serine in mice. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.16~18.
27. 山田清文, Yu Jinghua, 北原裕子, 衣斐大祐, 鍋島俊隆, 永井拓: 新生仔期 polyI:C 処置によって誘発される不安様行動および学習記憶障害に対するニコチンの効果. 第 117 回日本薬理学会近畿部会, 徳島 2010,7,8
28. 衣斐大祐, 永井拓, 中島晶, 鍋島俊隆, 山田清文: 発達期疑似ウイルス感染モデル動物の神経発達障害における Ifitm3 の役割. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会 第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台, 2010.9.15-17.
29. 山田清文, 衣斐大祐, 中島晶, 鍋島俊隆, 永

井拓：PolyI:C 誘発性神経発達障害モデル：結合失調症動物モデルとしての有用性と発症機構.第 20 回日本臨床精神神経薬理学会 第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台, 2010. 9.15-17.

30. 野田幸裕、毛利彰宏、肥田裕丈、安藤雄、間宮隆吉、山田清文、鍋島隆俊：新生仔期の PolyI:C 投与は若年期フェサイクリジン投与による情動・認知機能の生涯を増強する. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会 第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会、仙台 2010 9,15~17
31. 永井拓、于静華、北原裕子、衣斐大祐、鍋島俊隆、山田清文：新生仔期 polyI:C 処置によって誘発される不安様行動および学習記憶障害 2010.11.19. 第 20 回日本医療薬学会年会、千葉 2010 11,13~14 第 20 回日本医療薬学会年会、千葉 2010 11,13~14
32. 衣斐大祐、永井拓、中島晶、鍋島俊隆、山田清文：PolyI:C：誘発性神経発達障害における interferon-induced transmembrane protein 3 の役割. 第 118 回日本薬理学会近畿部会、大阪、2010 11 19
33. 衣斐大祐、永井拓、中島晶、鍋島俊隆、山田清文：神経発達期の免疫応答誘発性脳機能障害における IFITM3 の役割. 第 84 回日本薬理学会年会、2011.3.22~24.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

神経発生・発達過程における化学物質・環境ストレス負荷 による高次精神機能の変容

分担研究者：野田幸裕¹

研究協力者：安藤 雄¹，肥田裕丈¹，山田清文²，毛利彰宏^{1,2,3}，鍋島俊隆³

（¹名城大学薬学部病態解析学 I，²名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学，³名城大学薬学部薬品作用学）

[研究要旨]

本研究では、実験動物の神経発生・発達過程に環境的要因としての化学物質（免疫異常発現薬・精神異常発現薬など）や慢性社会ストレスを単独もしくは複合的に負荷し、その後に惹起される情動・認知障害について検討した。すなわち、新生仔期（生後2日齢から5日間）における二本鎖 RNA アナログ（Poly I:C）処置による免疫異常、幼若期（生後3週齢から10日間）における高攻撃性マウスへの暴露による慢性社会ストレスおよび若年期（生後6週齢以降）における精神異常発現薬（フェンシクリジン：PCP）の単回あるいは連続投与を複合的に負荷し、情動・認知機能に与える影響について行動薬理学的および神経化学的に検討した。その結果、1）慢性社会ストレス負荷マウスでは、社会性行動の障害が認められた。慢性社会ストレスによる社会性行動の障害は7日間のPCP連続投与により増強された。したがって幼若期のストレス暴露は成体期まで遷延し、成体期の精神機能異常やグルタミン酸作動性神経機能の低下を増悪させることが示唆された。2）PolyI:C単独処置マウスでは軽度の認知障害が認められるのみであったが、PCP急性投与による運動過多および7日間のPCP連続投与によって情動・認知障害は増強された。したがって新生仔期における免疫異常も成体期まで遷延し、グルタミン酸作動性神経機能を低下させることによって行動異常が顕在化することが示唆された。3）14日間PCPを連続投与したマウスの前頭前皮質においてグルタミン酸トランスポーター（GLAST）の発現は増加しており、GLASTヘテロ遺伝子欠損マウスではPCP連続投与による障害が認められなかった。PolyI:C処置マウスに7日間PCPを連続投与したマウスにおける前頭前皮質のGLASTの発現は、有意に増加しており、認知障害はGLAST阻害薬の前頭前皮質への注入により改善した。本研究から、神経発生・発達過程における化学物質・環境ストレス負荷による高次精神機能の変容の一部にはグルタミン酸作動性神経系の機能異常が関与しており、その脆弱性因子の一つとしてGLASTが同定された。本知見を精神疾患の発症機序や病態生理の解明および病態生理に基づいた治療法や予防法の開発につなげていきたい。

A. 研究目的

統合失調症や気分障害などの精神疾患は、神経発

生・発達過程における環境的要因（母体のウイルス感染などの物理化学的因子と養育環境などの

心理社会的因子の双方)と生得的に持っていた脆弱性因子(遺伝的要因)が相互に作用して発症に至ると考えられている(Bayer et al., 1999; Belmaker, 2004; Freedman, 2003; Maynard et al., 2001; McCarley et al., 1999). すなわち, 胎生期・周産期・生後発達期において遺伝的要因を含めた何らかの原因によって脳発達障害に伴う精神障害に対する脆弱性が形成され, 思春期以降における薬物摂取や社会的なストレスにより精神疾患を発症するもので, 2回打撃仮説(two-hit 仮説)と呼ばれる. 近年, 社会問題になっている幼少児に対する親の教育放棄や家庭内暴力および教師や同級生によるいじめ, 薬物乱用の低学年化などは, 精神疾患の発症に関与している神経発生・発達過程における環境的要因として考えられている(Heim et al., 2008). 本研究では, 実験動物の神経発生・発達過程に, 環境的要因としての化学物質(免疫異常発現薬・精神異常発現薬)や慢性社会ストレスを単独もしくは複合的に負荷し, その後に惹起される情動・認知障害について検討した. さらにそれら障害に関与する脆弱性因子の探索・同定を行った.

B. 研究方法

1. 実験動物

3週齢のC57BL/6J系雄性マウス, 4~12週齢のICR系雄性マウスおよび野生型であるC57BL/6J系妊娠マウスを使用した. グリア型グルタミン酸トランスporter (GLAST) 遺伝子欠損マウスは東京医科歯科大学田中幸一教授から供与された. なお, 倫理面への配慮として本実験計画は名古屋大学医学部動物実験委員会で承認され, 名古屋大学医学部動物実験指針および Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23, 1985) に準じて行った.

2. 薬物

フェンシクリジン塩酸塩 (phencyclidine hydrochloride; PCP) は Maddox ら (1965) の方法にしたがって名城大学薬学部 名誉教授 古川宏先生および薬品作用学教室教授 鍋島俊隆先生が合成したものを使用した. Polyriboinosinic-polyribocytidylic acid (Poly I:C, SIGMA 社, 米国), および dl-threo-β-Benzyloxy-aspartate (TBOA, Tocris Bioscience 社, 米国) を使用した.

3. 行動薬理的解析

3.1. 慢性社会ストレス負荷マウスにおける社会性行動試験

オープンフィールド (42×42×30 cm) の端に透明アクリル樹脂製のボックス (標的マウス区域: 10×6.5×30 cm, 直径 1 cm の数個の空気穴を有する) が設置された装置を使用した. 本試験は第1セッションと第2セッションからなり, 第1セッションでは, 実験装置に設置された標的マウス区域内に標的マウスを存在させず, 侵入マウスを30分間自由に探索させ, 侵入マウスの探索行動を評価した. 1分後に第2セッションを行った. 再び侵入マウスを標的マウス区域に標的マウスを存在させた装置に入れ, 5分間自由に探索させ, 侵入マウスの探索行動を録画した. なお, 社会性行動試験での標的マウスには, 侵入マウスがこれまでに一度も接触したことがない覚醒下あるいは麻酔下のICR系雄性マウスを用いて試験を行った. 各セッションでの交流区域における滞在時間および装置内の総移動距離を解析した.

3.2. 運動量測定試験

PCP 投与直後に側面が透明, 床面が黒色つや消しで構成されたアクリル製ケージ (45×26×40 cm) にマウスを入れ, 120分間の自発運動量を Scanet SV-10 (ブレインサイエンス・イデア社, 大阪)

により測定した。

3.3. 断崖回避試験

マウスを 500 mL ビーカーの底の上に置き、マウスがジャンピングするまでの時間 (jumping latency: カット・オフ 5 分) を測定した。

3.4. 社会性行動試験

マウスを灰色の亚克力製ボックス (25×25×30 cm) の装置に馴化させるため、2 日間はマウスを 1 匹ずつ装置に入れ、10 分間自由に探索させた。3 日目にマウスを異なるケージ内で飼育していた C57BL/6J マウス (6 週齢: 標的マウス) と同時に装置中央に入れた。その直後から 10 分間、マウスが標的マウスに対して嗅ぐ行動、追いかける行動、上に乗りかかる行動、下に潜ろうとする行動のいずれかを示している時間を社会性行動として測定した。

3.5. 新奇物体認識試験

マウスを open-field box (40×40×29 high cm) に入れ、10 分間の馴化を 3 日間行った。馴化 3 日目の翌日に、2 種類の異なった object を box 内に離して置き、マウスを入れ、各 object に対する探索嗜好行動を 10 分間測定した (訓練試行)。訓練試行の 24 時間後に、2 種類の object のうち片方の object を全く異なった新奇 object と置換し、各 object に対する探索嗜好行動を 10 分間測定した (テスト試行)。それぞれの object に対する探索嗜好行動の割合を、object へのアプローチ時間より算出した。

3.6. 強制水泳試験

マウスを水 (22~23°C) が入ったプラスチック製シリンダー (直径 15 cm, 高さ 20 cm) に入れ、Scanet MV-10 AQ 装置 (ブレインサイエンス・イデア社) により 3 分間の泳動時間を測定した。無

動時間を 180 (秒) - 泳動時間 (秒) により算出した。

4. 生化学的解析

4.1. ニッスル染色

マウスを灌流固定した後、脳を摘出した。摘出した脳は 20 μ m の厚さで切片を作製し、定法にしたがってニッスル染色を行った。

4.2. ウェスタンブロッティング法

マウスを断頭し、氷冷下で前頭前皮質を摘出した。脳サンプルは溶解バッファー中で超音波破碎し、ホモジナイズした。ホモジナイズサンプルを遠心分離し、得られた上清にサンプルバッファーを加え、煮沸した。サンプルをポリアクリルアミドゲルにより電気泳動を行い、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜へタンパク質を転写し、ブロッキングした。PVDF 膜に 1 次抗体 (GLAST, GLT-1, Serine racemase: SR, glutamate synthetase: GLS, vesicle glutamate transporter-1: VGLUT-1, GFAP) を加え、インキュベーションした後、horseradish peroxidase を結合させた 2 次抗体を加え、インキュベーションした。ECL を用いて免疫複合体を検出し、タンパク質の発現量を画像解析により算出した。

5. 統計学的解析

得られた結果は全て平均値±標準誤差として示した。統計学的解析には、一元配置分散分析あるいは繰り返しのある二元配置分散分析を用い、各群間の比較には Bonferroni の多重比較検定を行った。また、2 群間の比較の場合には、“対応のある”あるいは“対応のない”Student の t 検定を用いた。全ての統計解析において有意水準を 5% と設定し、危険率 5% 未満の場合を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

1. 慢性社会ストレス負荷マウスの行動解析 (平成 20・21 年度)

3 週齢の C57BL/6J 系雄性マウスを侵入マウスとして、1 匹ずつ、4~12 週齢の攻撃性の高い ICR 系雄性マウスの飼育ケージに入れ、1 日 10 分間、10 日間物理的に接触させた。その後、行動解析を行った。

1.1. 慢性社会ストレス負荷マウスにおける社会性行動

対照群 (control 群) および慢性社会ストレス負荷マウス (stress 群) の 1 日あたりの平均攻撃負荷時間はそれぞれ 0.6 ± 0.1 および 102.6 ± 4.8 秒であり、stress 群における平均攻撃負荷時間は有意に長かった。社会性行動試験における control 群および stress 群の交流区域滞在時間を図 1 に示した。Control 群および stress 群における第 1 セッションの交流区域滞在時間には、いずれの試験日においても、有意な差は認められなかった。図 1A に示したように、第 1 回目の社会性行動試験において、control 群の第 2 セッションにおける交流区域滞在時間は、第 1 セッションのそれと比較して有意に延長し、標的マウスに対して社会性行動を示した。一方、stress 群の第 2 セッションにおいて、交流区域滞在時間は、標的マウスが存在しているにもかかわらず、第 1 セッションのそれと比較して有意に延長せず、control 群のそれと比較して有意に短縮していた。同様の結果は、第 2 および 3 回目の社会性行動試験においても認められた (図 1B と C)。なお、第 1 回目の社会性行動試験における第 1 セッションの総移動距離は、control 群 ($1,752 \pm 97$ cm) と stress 群 ($1,435 \pm 100$ cm) との間に有意な差は認められなかった。

非覚醒下 (麻酔下) の標的マウスを用いた場合では、stress 群においても第 1 セッションのそれと比較して有意に延長した (図 2B)。同様の現象は、居住マウスと 10 日間接触させた 8 (第 2 回目) お

よび 15 (第 3 回目) 日後にも認められた (データ示さず)。Stress 群において標的マウス非存在下と比較して存在下では、隅部滞在時間の有意な延長も認められた (データ示さず)。

1.2. 慢性社会ストレス負荷マウスにおけるフェンシクリジン (PCP) 連続投与による社会性行動への影響

Control 群および stress 群に精神異常発現薬である非競合的 NMDA 受容体拮抗薬の PCP を連続投与し、慢性社会ストレス負荷マウスの社会性行動への影響を検討した。第 1 回目の社会性行動試験終了後、直ちに control 群および stress 群に saline あるいは PCP (10 mg/kg/day s.c.) を 7 日間連続投与し、最終投与の 1 日後 [居住マウスと接触させた最終日から 8 (第 2 回目) 日後] に社会性行動試験を行った。図 2C に示したように、第 1 セッションの交流区域滞在時間は、いずれの群においても有意な差は認められなかった。Saline/control 群における第 2 セッションの交流区域滞在時間は、

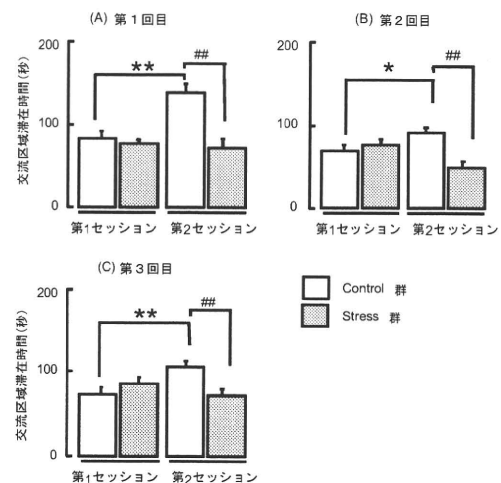


図 1. 対照マウス (control 群) および慢性社会ストレス負荷マウス (stress 群) における社会性行動。(A) 第 1 回目の社会性行動。(B) 第 2 回目の社会性行動。(C) 第 3 回目の社会性行動。居住マウスと 10 日間接触させた 1 (第 1 回目)、8 (第 2 回目) および 15 (第 3 回目) 日後に社会性行動試験を行った。グラフは平均±標準誤差で示した (control 群: n=13, stress 群: n=17)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs 各群の第 1 セッション (対応のある t 検定), ## $p < 0.01$ vs 対応する control 群 (対応のない t 検定)。

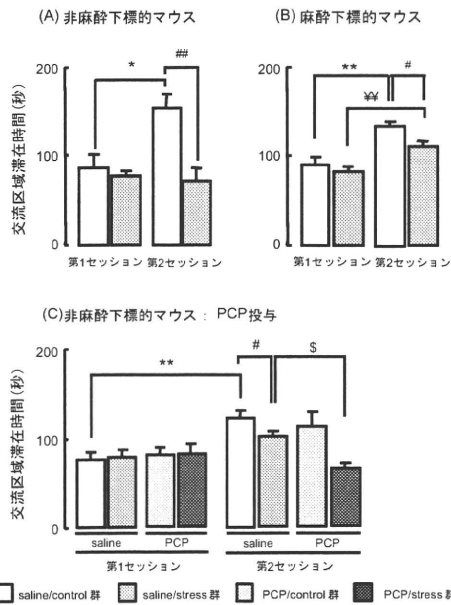


図2. 対照マウス (control群) および慢性社会ストレス負荷マウス (stress群) における社会性行動。(A) 覚醒標的マウス存在下における社会性行動 (saline/control群: n=13, saline/stress群: n=17)。(B) 非覚醒 (麻酔) 標的マウス存在下における社会性行動 (saline/control群: n=14, saline/stress群: n=14)。(C) フェンシクリジン (PCP) 連続投与した対照群および慢性社会ストレス負荷マウスにおける社会性行動 (saline/control群: n=6, saline/stress群: n=8, PCP/control群: n=6, PCP/stress群: n=8)。グラフは平均±標準誤差で示した。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs 第1セッションの saline/control群 (対応のある t 検定), # $p<0.05$, ## $p<0.01$ vs 第2セッションの saline/control群 (対応のない t 検定), \$\$\$ $p<0.01$ vs 第1セッションの saline/stress群 (対応のある t 検定), \$ $p<0.05$ vs 第2セッションの saline/stress群 (対応のない t 検定)。

第1セッションのそれと比較して有意に延長し、社会性行動が認められた。salineを投与した stress群 (saline/stress群) における第2セッションの交流区域滞在時間は、saline/control群のそれと比較して有意に短く、社会性行動の障害が認められた。Stress群にPCP (10 mg/kg/day s.c.) を7日間連続投与したところ、PCP/stress群における第2セッションの交流区域滞在時間は、PCP/control群のそれに比べて有意に減少し、社会性行動の障害が増悪された。

1.3. 神経細胞の形態学的変化

Stress群の海馬における神経細胞は、control群のそれと比べて形態学的変化は観察されなかった (データ示さず)。

2. 新生仔期 PolyI:C 処置マウスの行動解析 (平成21年度)

妊娠マウスの出産2日後から、その新生仔マウスに saline あるいは Poly I:C (5 mg/kg/day s.c.) を5日間投与した群をそれぞれ saline群あるいは Poly I:C群とした。Saline群の4週齢からPCP (10 mg/kg/day s.c.) を14日間 (saline/PCP群)、あるいは Poly I:C群の5週齢からPCP (10 mg/kg/day s.c.) を7日間 (Poly I:C/PCP群) 投与し、行動解析を行った。

2.1. 新生仔期 PolyI:C 処置マウスにおけるフェンシクリジン (PCP) 連続投与による運動過多への影響

行動量測定試験において saline群にPCP (10 mg/kg/day s.c.) を急性投与すると、運動量が増加した (表1)。Saline群の4および5週齢からPCP (10 mg/kg/day s.c.) をそれぞれ14および7日間投与すると、運動過多の増強 (行動感作) が認められた (表1)。新生仔期に Poly I:C を投与しておく (Poly I:C群)、PCP急性投与による運動過多およびPCP連続投与による行動感作は増強された (表1)。

2.2. 新生仔期 PolyI:C 処置マウスにおけるフェンシクリジン (PCP) 連続投与による衝動性の増加への影響

断崖絶壁試験において saline群にPCP (10 mg/kg/day s.c.) を7日間連続投与しても jumping latencyの短縮 (衝動性の増加) は認められなかったが、14日間連続投与すると衝動性の増強が認められた (表1)。Poly I:C群にPCPを7日間連続投与すると、saline群にPCPを14日間連続投与した場合と同程度の衝動性が増強された (表1)。

2.3. 新生仔期 PolyI:C 処置マウスにおけるフェンシクリジン (PCP) 連続投与による社会性行動の低下への影響

社会性行動試験において saline 群に PCP (10 mg/kg/day s.c.) を7日間連続投与しても社会性行動の障害は認められなかったが, 14日間連続投与すると社会性行動の障害が認められた (表1). Poly I:C群にPCPを7日間連続投与すると, saline群にPCPを14日間連続投与した場合と同程度の社会性行動の障害が認められた (表1).

2.4. 新生仔期 PolyI:C 処置マウスにおけるフェンシクリジン (PCP) 連続投与による物体認知記憶の障害への影響

新奇物体認知試験において saline 群に PCP (10 mg/kg/day s.c.) を14日間連続投与すると新奇物体に対する探索時間の短縮 (物体認知記憶の障害) が認められた (表1). Poly I:C群にsalineを7日間投与しても軽度な物体認知記憶の障害が認められたが, PCPを7日間連続投与すると saline群にPCPを14日間連続投与した場合と同程度の物体認知記憶の障害が認められた (表1).

	PCP 14日間投与 (4-6週齢)	PCP 7日間投与 (5-6週齢)	Poly I:C 5日間投与 (2-7日齢)	Poly I:C 5日間投与 (2-7日齢) +PCP 7日間投与 (5-6週齢)
PCPiに対する応答性 (行動量測定試験)	↑	↑	±	↑
衝動性 (新置回避試験)	↑	±	±	↑
社会性 (社会性行動試験)	↓	±	±	↓
物体認知記憶 (新奇物体認識試験)	↓	±	↓	↓

↑ (↑): 増加 ↓ (↓): 低下・障害 ±: 変化なし

表 1. 新生仔期 PolyI:C 処置マウスにおけるフェンシクリジン (PCP) 連続投与による行動変化

3. フェンシクリジン (PCP) 連続投与による行動変化におけるGLASTの関与 (平成22年度)

GLASTヘテロ遺伝子欠損マウスにPCP (10 mg/kg/day s.c.) を14日間連続投与し, 行動解析を行った.

3.1. GLASTヘテロ遺伝子欠損マウスにおけるフェンシクリジン (PCP) 連続投与による意欲低下への影響

強制水泳試験において野生型マウスにPCP (10 mg/kg/day s.c.) を14日間連続投与すると無動時間の延長 (意欲の低下) が認められた. 一方, GLASTヘテロ遺伝子欠損マウスにPCPを14日間連続投与しても意欲の低下は認められなかった (図3).

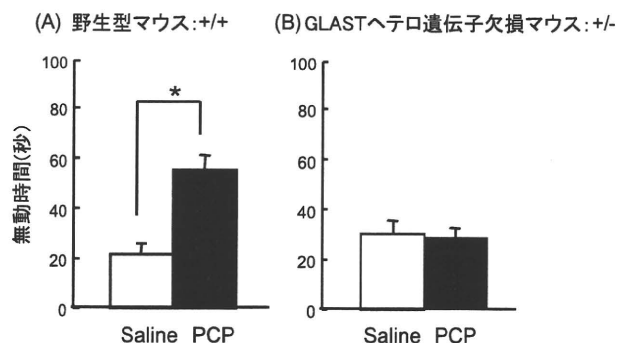


図 3. GLASTヘテロ遺伝子欠損マウスにおけるフェンシクリジン (PCP) 連続投与による意欲低下への影響. (A) 野生型マウス (+/+) および (B) GLASTヘテロ遺伝子欠損マウス (+/-) に14日間 saline (□) もしくはPCP (■) を連続投与し, 24時間後に強制水泳試験を行った. グラフは平均±標準誤差で示した. *p<0.05 vs 各マウスの saline 投与群 (対応のある t 検定).

3.2. GLASTヘテロ遺伝子欠損マウスにおけるフェンシクリジン (PCP) 連続投与による認知機能への影響

新奇物体認識試験において, 野生型マウスにPCP (10 mg/kg/day s.c.) を14日間連続投与すると新奇物体に対する探索嗜好率の低下 (物体認知記憶の障害) が認められた. 一方, GLASTヘテロ遺伝子欠損マウスにPCPを14日間連続投与しても物体認知記憶の障害は認められなかった (図4).